



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 31/19, C12Q 1/02 // C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/04815</p> <p>(43) 国際公開日 1999年2月4日 (04.02.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03266</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月22日 (22.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/198232 1997年7月24日 (24.07.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 下川晃彦 (SHIMOKAWA, Teruhiko) [JP/JP] 西嶋智見 (NISHIJIMA, Satomi) [JP/JP] 松田光陽 (MATSUDA, Koyo) [JP/JP] 飯泉祐一 (IIZUMI, Yuichi) [JP/JP] 橋本誠一 (HASHIMOTO, Seiichi) [JP/JP] 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.) 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許情報部内 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS WITH CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT</p> <p>(54) 発明の名称 コレステロール低下作用を有する医薬組成物</p> <p>(57) Abstract Medicinal compositions with a cholesterol-lowering effect containing as the active ingredient compounds having the effect of activating a peroxisome proliferating agent activating receptor PPARδ or the effect of activating PPARδ or pharmaceutically acceptable salts thereof; medicinal compositions with an LDL-cholesterol-lowering effect; and a method for identifying compounds with a cholesterol-lowering effect characterized by assaying the effect of activating a peroxisome proliferating agent activating receptor PPARδ or the effect of activating PPARδ and γ. Means for Solution: it has been found that compounds with an excellent cholesterol-lowering effect on humans or higher organisms such as ape have the effects of activating PPAR δ alone or together with PPAR γ. There has been established a method for identifying compounds with a cholesterol-lowering effect whereby the aimed compounds can be quickly and efficiently screened and selected from among a number of compounds by assaying the effects of activating PPAR δ alone or together with PPAR γ.</p>		

(57)要約

本発明は、ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用, 又は PPAR δ 活性化作用を有する化合物又は製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下作用を有する医薬組成物、コレステロール低下作用が LDL-コレステロール低下作用である医薬組成物、更にコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法としてペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用, 又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を測定することを特徴とする方法を提供することを目的とする。

解決手段 ヒトあるいはサル等の高等生物において優れたコレステロール低下作用を有する化合物は PPAR δ 又は δ 及び γ 活性化作用を有することを見出した。また、PPAR δ 活性化作用, 又は PPAR δ 及び γ 活性化作用の測定により、多数の化合物から迅速且つ効率的にスクリーニングし選択し得るコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法を見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

コレステロール低下作用を有する医薬組成物

技術分野

本発明は、(1)PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物、又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下を有する医薬組成物、(2)コレステロール低下作用が LDL-コレステロール低下作用である医薬組成物、(3)p-[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸、又はその製薬学的に許容される塩を有効成分とするコレステロール低下作用を有する医薬組成物、及び(4)コレステロール低下作用を有する化合物を同定するための方法であって、ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び PPAR γ 活性化作用を測定することを特徴とする方法、に関する。

背景の技術

血中脂質レベルの増加、特に LDL (low density lipoprotein)-コレステロールレベルの増加は、動脈硬化症を引き起こす重要な原因の一つとして考えられている。今までに知られている LDL-コレステロール低下薬としては、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA (ヒドロキシメチルグルタリル CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzymeA) 還元酵素の阻害剤や腸管内でのコレステロールの再吸収抑制剤などがある。例えば、HMG-CoA 還元酵素阻害剤投与による血清 LDL-コレステロール低下の機序は、主として肝臓でのコレステロール生合成阻害による細胞内コレステロールとその代謝産物生成量の低下及びそれによる LDL 受容体発現亢進作用に基づくものであるとされる (J.Lipid Res., 33, p1569-1582, 1992)。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤の 1 つ、シンバスタチンの第 1 相臨床試験では、健常人の血清コレステロールレベルは投与開始約 1 週間で約 20% の低下率を示し、その後の投与でもより継続した低下は期待できないことが示されている。また、血清総コレステロール 220mg/dl 以上の高脂血症患者においても、その低下率は約 20% 程度であるこ

とが示されている(山本章ほか, 臨床医薬, 4(3), p409, 1988)。

一方, 特公昭 63-35626 号公報に記載されている YM-16638 化合物は, 元来, 強い SRS-A(スロー・リアクティング・サブスタンス・オブ・アナフィラキシー; slow reacting substance of anaphylaxis)拮抗作用を有する化合物であり, 種々のアレルギー性疾患(例えば気管支喘息, じん麻疹)や虚血性の心及び脳疾患, 炎症などの予防・治療剤並びに抗潰瘍剤として有用なことが知られている(Arzneim.-Forsch. Drug Res., 38(1), p682-685, 1988, Prostaglandins Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 36, p43-47, 1989)。

この化合物の抗潰瘍・抗喘息薬としての臨床試験において, 意外にもヒトで強力な血清コレステロール低下作用を有することが見出され, また動物実験においても同様な作用を示すことが確認されている(Drug Dev. Res., 38, p86-92, 1996, 特開平 2-215717 号公報)。上記の血清コレステロールの低下率は, 健常人に対して約 26% (60mg 投与)～

41% (120mg 投与)であり(Drug Dev. Res., 38, p86-92, 1996), 初期第Ⅱ相臨床試験においても約 20%～50%の低下率を示す割合は被検者の約 80%を示した。このようなヒトに対する強い血清コレステロールの低下作用は, HDL (high density lipoprotein) -コレステロールの低下ではなく, LDL -コレステロール, アポ蛋白質 B の有意な低下に起因するものであり, 一方, 血清トリグリセリドレベルに対してはその低下作用は弱いことが判っている(Drugs, 53(2), p299-336, 1997)。

YM-16638 の血清コレステロール低下作用機序に関するこれまでの研究から, 肝臓でのコレステロール生合成阻害効果を有すること(Br. J. Pharmacol., 118, p174-178, 1996)並びに肝臓での LDL 受容体の活性化と LDL 受容体遺伝子発現レベルを増加させる作用を有することが知見されている(Drug Dev. Res., 38, p86-92, 1996)。しかしながら, これらの作用を引き起こす YM-16638 化合物の作用機序の更なる詳細については不明であった。

近年, 血中脂質レベルの低下にも関与する脂肪細胞の分化増殖の機序に関する研究の中で, 核内受容体である PPAR (ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体; peroxisome proliferator-activated receptor)の存在が見出された(Nature, 347, p645-650, 1990)。PPAR にはこれまでに大きく分けて 3 つのサブタイプの存在が知ら

れており、PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ と称する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, p7355-7359, 1994, 蛋白質・核酸・酵素, 40(13), p50-55, 1995)。更に、種々の化合物について、PPAR のサブタイプの活性化やその脂質低下作用についての報告がなされている。例えば、糖尿病治療薬であるチアソリジンジオン系化合物は、PPAR γ のリガンドであり、ヒトにおいて血清中のコレステロールレベルは低下させないが、血清トリグリセリドレベルを有意に低下させることが知られている (Diabetes, 46, p433-439, 1997, Diabetes Care, 19(2), p151-156, 1996, 15(2), p193-203, Diabetologia, 39, p701-709, 1996 <文献1>)。一方、古くから脂質低下薬として用いられているフィブレート系薬剤は、PPAR α のリガンド効果を有することが知られており、臨床では、強い血清トリアシルグリセロールレベルの低下が総じて認められている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, p4312-4317, 1997, Drugs, 40(2), p260-290, 1990 <文献2>)。

フィブレート系薬剤と共に PPAR α の特異的リガンドとして、Wyl4,643 (Pirinixic acid) が知られているが (EMBO J., 11, p433-439, 1992, Arch. Biochem. Biophys., 228(1), p185-196, 1984, <文献3>)、高等生物に対する脂質低下作用について報告はない。この他、抗血栓薬などとして用いられるプロスタサイクリン (PGI₂) 自体には PPAR α も PPAR δ も活性化作用はないことが確認されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, p4312-4317, 1997)、その誘導体であるカルバプロスタサイクリン (cPGI₂) には、PPAR α と PPAR δ の両リガンド活性のあることが報告されている。しかし、該化合物の脂質低下作用に関する詳細は未だ報告されてはいない (J. Biol. Chem., 272(9), p5367-5370, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, p4312-4317, 1997 <文献4>)。

一方、英国公開公報 GB 2292885 には、NUC1 (ヒト PPAR δ) 受容体を活性化する物質を投与することによる高脂血症薬がクレームされているが、明細書に開示された脂肪酸酸化に関連する酵素のレベルを調節する旨の記載は、トリグリセリドの代謝に関連するものであり、コレステロール低下作用については何ら開示も示唆もされていない。

従って、以上の知見にも拘わらず、血清コレステロール低下作用に PPAR のいずれのサブタイプが関与しているのかについては、未だ確認されていない。

PPAR のサブタイプが関与する新規作用機序に基づくコレステロール低下剤は、治療

上従来薬よりも優れた効果を示すことが期待できる。現状では、上記作用機序が明らかにされておらず、充分満足できる薬剤が見い出されてはいない。そこで、PPAR のサブタイプが関与する作用機序が明らかであり、優れたコレステロール低下作用を有し、医薬品として充分満足できる薬剤の開発が切望されている。

発明の開示

本発明者等は、上記 YM-16638 のコレステロール低下の作用機序について、鋭意研究を行った結果、該化合物が PPAR δ 及び γ 活性化作用を有することを本発明により初めて見出した。この知見、及び PPAR γ のリガンドであるチアゾリジンジオン系化合物が血清コレステロールレベルを低下させないとの従来報告から、上記コレステロールの低下作用には PPAR δ が主に関与しているのではないかと考え、PPAR δ 活性化作用を有する化合物について更に研究した。即ち、PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を測定することを特徴とする方法を用いることにより、PPAR δ 活性化作用を有する化合物を探索した。この結果、チェコ登録特許 CZ 281130 に抗炎症作用、抗喘息作用を示す化合物として開示された p -[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸が PPAR δ 及び γ 活性化作用を有し、且つ意外にも YM-16638 と同様に優れた血清コレステロール低下作用及び LDL-コレステロール低下作用を示すことが高等動物を用いた実験において見出され、これらの知見に基づいて本発明を完成した。

即ち、本発明は、PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物、又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下作用を有する医薬組成物に関する。

また、本発明は、上記コレステロール低下作用が LDL-コレステロール低下作用である医薬組成物に関する。

更に本発明は、 p -[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下作用を有する医薬組成物に関する。

更にまた、本発明は、コレステロール低下作用を有する化合物を同定するための方法であって、PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を測定することを特徴

とする方法に関する。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明において、「ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR 活性化作用」とは、その受容体のリガンド結合部位に化合物が直接的に結合・作用し、もしくは間接的に作用し、そのリガンド結合受容体によって機能発現が引き起こされる初期段階の作用の全てを意味し、その受容体活性化作用を測定することにより求められる測定値が、化合物非添加（ここでは溶媒として用いたジメチルスルフォキサイド添加）の細胞での活性値と比較して、統計学的に有意差があると判定した場合に「活性化作用あり」と判断する。

本発明において「コレステロール低下作用」とは、病態レベルの血清中のコレステロール値（治療の必要とされる通常 220mg 以上）を有意に低下させる作用を意味し、コレステロール低下作用を示す医薬組成物は、血清コレステロールの上昇に起因する各種疾患の予防及び治療に有用である。

本発明のコレステロール低下作用を有する医薬組成物が有効成分として含有する「PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物」とは、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物の中から本発明のコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法により選択されたもの、あるいはこれら選択された化合物の母核を利用した置換基変換により新規に合成した化合物等、公知又は新規に拘わらず PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物を全て包含するものである。

「製薬学的に許容される塩」とは、該化合物が酸又は塩基と形成する塩であり、生体に対し非毒性であるものを意味する。

具体的には、無機酸若しくは有機酸との酸付加塩、あるいは無機若しくは有機塩基との塩であり、製薬学的に許容しうるこれらの塩としては、具体的には塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸若しくは磷酸等の鉱酸、又はギ酸、酢酸、プロピオン酸、シユウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸若しくは、トルエンスルホン酸等の有機酸、又はアスパラギン酸若しくはグルタミン酸などの酸性アミノ酸との付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、リチ

ウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩やアンモニウム塩等を挙げることが出来る。

更に、本発明化合物は水和物、エタノール等との溶媒和物や結晶多形を形成する場合があり、本発明は、これらの水和物、溶媒和物又は結晶多形の分離されたものあるいは混合化合物を全て包含する。

本発明のコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法は、ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を測定することの特徴とする方法であり、化合物の PPAR δ 、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用の確認や、コレステロール低下作用を有する化合物を選択する方法を提供するものである。該方法は、(a) PPAR δ あるいは PPAR γ 受容体の機能的断片をコードする発現カセットの構築物の作成、(b) 上記受容体断片と結合する機能蛋白断片についての 1、又は複数の応答要素、及びレポーター遺伝子の結合した構築物の作成、(c) この構成物を用いる宿主への共トランスフェクション、(d) 試験される化合物の添加、及び (e) レポーター遺伝子の発現の測定、(f) 試験化合物をコントロールと比較し、PPAR δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を示す化合物を選択する工程からなり、該方法を用いることにより多数の化合物を迅速且つ効率的に測定し、ランダムスクリーニングすることが可能である。

上記工程 (a) 及び (b) は、近年、核内受容体のリガンド評価系として確立されたものであり、詳細は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に発現するガラクトース代謝酵素調節蛋白質 GAL4 [GAL1 (galactokinase), GAL7 (α -D-galactose-1-phosphate uridylyltransferase), GAL10 (uridine diphosphoglucose-4-epimerase) の発現調節因子とその応答配列 UAS_G (galactose upstream activating region) との結合を利用したレポーター系である (Cell, 40, p767-774, 1985, 52, p161-167, 1988, 52, p169-178, 1988, 54, p199-207, 1988)。後記実施例 1 に記載の、酵母の GAL4 蛋白の DNA 結合能を利用したレポーターシステム (J. Biol. Chem., 270(22), p12953-12956, 1995) 以外に、PPAR の DNA 結合領域が結合する応答領域 (peroxisome proliferator responsive

element, PPRE)を利用したレポーターシステム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, p4312-4317, 1997, 91, p7355-7359, 1994, J. Biol. Chem., 268(8), p5530-5534, 1993) やバクテリアテトラサイクリンオペロンを利用したレポーターシステム(J. Biol. Chem., 270(41), p23975-23983, 1995)などが利用可能である。

実施例1に記載の、ベクターの構築に必要な遺伝子操作に関する基本的技術については、Basic Methods in Molecular Biology, 2nd Edition (Leonard G. Davis, W. Michael Kuehl, James F. Battey, Prentice-Hall International Inc., 1994) 及び細胞工学・別冊, “バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎” [中山広樹, 西方敬人著(秀潤社)(1995年)]を参考に行うことが可能である。

本発明の工程(a)で使用する遺伝子発現ベクターは、GAL4蛋白質のDNA結合領域(GAL4-DBD)をコードする遺伝子を既に含む市販のベクター、pGBT9 DNA-Binding Domain Vector (ベクターサイズ 5.5kb, GAL4-DBD 領域とアンピシリン耐性遺伝子 Amp^R 配列をベクター内に有する; 加テック社製)であり、その GAL4-DBD 領域の近傍にあるマルチプルクローニングサイト(MCS)に目的とする核内受容体のリガンド結合領域を導入することによって、細胞内で発現されるキメラ蛋白質が本同定法におけるセンサーとなり得るのに充分都合の良いものであって、pGBT9 に代えて製品 pAS2 DNA-Binding Domain Vector(加テック社製)を用いることもできるし、文献(Cell, 52, p169-178, 1988)に記載の方法やその変法を利用することによっても構築は可能である。

工程(b)で使用する、活性化キメラ蛋白質に対する応答要素とレポーター遺伝子の融合ベクターは、公知である応答要素を構築して市販のルシフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクター(ピカジーンベクター2(PGV-B2), 東洋インキ製造(株))に導入したものであり、その方法は、通常、適当な制限酵素部位を有する短い断片を経由して挿入される。即ち、例えば、レポーター遺伝子の近くに組み込むために、例えば適当な制限酵素を有するレポーター遺伝子を切断し、応答要素を挿入するというような慣用手段を用いて行い、使用する適当な末端を有する応答要素の構築はDNA合成機上で合成される。

更には、公知の応答要素は、DNA合成機により作成することも可能であるが、pG5CAT reporter plasmid(加テック社製)のように既に市販の適当なベクターに組み込まれて

いるものを使用することも可能であり、好ましくは、化合物の同定に使用する後記宿主中で応答性の良い応答要素を選択、使用することが望ましい。

適当なプロモーター、及びターミネーター配列は、好ましくは後記宿主中で活性であるように選択され、当業界で良く知られているものである。それらは、構造遺伝子、及び任意にマーカー基、及び他の遺伝子工学における標準的技術によって好都合な要素と結合し得る。

本発明のコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法で述べた、工程(c)で作成した構築物の発現に用いる好ましい宿主細胞とは、例えば細菌、例えば酵母のような真菌、昆虫又は哺乳類の細胞であり、HepG2細胞、NIH-3T3、COS-1、COS-7、U-937、CV-1、KI-293等が代表的なものであり、特にHepG2やCV-1、NIH-3T3細胞が好ましい。これらの細胞を用いた遺伝子導入に関する実験条件は、好ましくは細胞障害性の少ない、導入遺伝子量が多くかつ分解されにくい条件であって、後記実施例1において利用したリポフェクトアミンによる遺伝子導入方法に限らない。

工程(d)は、ケミカルファイルに登録されている公知化合物あるいは新規に合成した化合物を適当な希釈倍率で希釈したものを、遺伝子を導入しておいた細胞の培地に添加し、後記工程(e)の測定を行うものであり、例えば96ウェルプレートを用いる High through put screening 系として処理することが可能である。

工程(d)において、化合物は適当な溶媒に溶解した条件下で細胞の培地中に添加されるものであって、そのインキュベーションの方法としては、細胞内に導入した2つの遺伝子とそれらに作用する物質が、最終的にレポーター活性として測定するのに必要十分な条件下で行い、化合物が細胞膜を通過できなければ、適当な単体を加えるか、細胞のない系を用いることも可能である。

本発明におけるレポーター遺伝子の発現に関しては、例えば、産生蛋白質、酵素活性、もしくは細胞増殖量のような、転写レベル、又は翻訳レベルで測定し得る。

工程(e)において測定の対象となる指標としては、適当なレポーター遺伝子が当業界では良く知られている。例としては、ホタルルシフェラーゼ(luc, PGV, ピカジン社製)の他に、シーパンジールシフェラーゼ(luc, pRL, ピカジン社製)、細菌ハイブリドルシフェラーゼ(luxAB)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -D-ガラクトシダーゼ(lacZ)である。

工程(f)において、コントロールとして試験化合物の溶媒を用い、溶媒のみで処理した細胞で工程(e)のレポーター遺伝子発現の指標を測定し、その活性値（コントロール値）を1.0として、試験化合物の相対的なリガンド活性を算出する。PPAR δ 若しくは PPAR δ 及び γ に対して有意に活性化作用を示す化合物を選択する。

産業上の利用可能性

本発明により提供される医薬組成物は、新規作用機序、即ち、ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体のサブタイプである PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有することを特徴とするものであり、特にヒトやサルなどを含む高等生物において従来薬よりも薬効の点において非常に優れていることが期待されるものである。

本発明の p-[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸は、その化学構造中の水酸基等に基づき、ケト-エノール互変異性体等の各種異性体が存在するが、本発明はこれらの異性体の単離されたもの、あるいは混合物の全てを包含する。

また本発明化合物は、塩基と塩を形成する。塩基との塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リジン、アルギニン、オルニチン等の有機塩基との塩やアンモニウム塩が挙げられる。更に、本発明化合物は、その理化学的性質や製造条件により水和物、エタノール等との溶媒和物、あるいは結晶多形をなす種々の結晶形を有する物質として得られることがある。本発明にはこれら水和物、エタノール等との溶媒和物、及び種々の結晶形の物質全てが包含される。

本発明化合物は、後記製造例1に記載の方法又は当業者に公知のその変法により製造することが可能であり、遊離のまま、あるいはその塩として単離される。本発明化合物の塩は遊離の酸又は塩基である本発明化合物に通常の造塩反応を付することにより製造できる。単離精製は、抽出、濃縮、留去、結晶化、濾過、再結晶、各種クロマトグラフィー等、通常の化学操作を適用して行われる。各種の異性体は、異性体間の物理化学的な性質の差を利用して常法により単離できる。

発明の効果

本発明のコレステロール低下作用を有する医薬組成物は、新規作用機序である PPAR

δ 活性化作用、又は PPAR δ 及び γ 活性化作用に基づき、特にヒトあるいはサル等の高等生物において、優れた血清コレステロール低下作用、特に LDL-コレステロール低下作用を示すものである。

また、本発明のコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法は、実際にコレステロール低下作用に優れた化合物を選択するのに有用な方法であることが確認されており、多数の化合物から迅速且つ効率的に目的とするコレステロール低下作用を有する化合物をスクリーニングし選択する上で極めて有用である。

従って、本発明の医薬組成物は、上記作用に基づき、血清コレステロール特に LDL-コレステロールの増加に起因する各種疾患、即ち、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫、動脈硬化、又は動脈硬化に起因する各種疾患（冠状動脈硬化に基づく狭心症や心筋梗塞等の虚血性心疾患、脳血管の硬化による脳梗塞や脳出血等の脳血管障害、硬化した脳動脈の機械的圧迫による視神経萎縮や水頭症、腎動脈硬化に基づく腎硬化症、大動脈や末梢動脈の内腔狭窄による動脈留や閉塞性動脈硬化症等）等の予防及び治療に極めて有用である。

本発明の、PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物、又はその塩の 1 種、又は 2 種以上を有効成分として含有する製剤は、通常製剤化に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、あるいは静注、筋注等の注射剤、坐剤、経皮等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。投与量は、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して、個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常、経口投与の場合、成人 1 日当たり 1～500mg 程度、非経口投与の場合、成人 1 日当たり 0.1～50mg 程度であり、これを 1 回で、あるいは 2～4 回に分けて投与する。

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、1 つ又はそれ以上の活性物質が、少なくとも 1 つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸、アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グルコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸、又はアスパラギン酸の

ような溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の糖衣又は胃溶性あるいは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性、又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（商品名）等がある。このような組成物は、更に防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定剤（例えば、ラクトース）溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでいてもよい。これらは例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水、又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲記し、本発明のコレステロール低下作用を有する化合物の同定方法、コレステロール低下剤及び化合物について更に詳細に説明する。

実施例1（コレステロール低下作用を有する化合物の同定方法）

(1) アクチベーションベクターの構築

PPAR δ 及び PPAR γ のリガンド効果を有する化合物を同定するために、酵母転写活性化蛋白質 GAL 4 の DNA 結合ドメイン (GAL4-DNA binding domain, GAL4-DBD) と PPAR のリガンド結合ドメイン (ligand binding domain, LBD) との融合遺伝子発現ベクター（作成した3つのアクチベーションベクターを GAL-PPAR α 、GAL-PPAR δ 、GAL-PPAR γ と命名した）の構築を行った。操作は、i) 第一段階を PPAR-LBD のクローニング、ii) 第二段階を GAL4-DBD 遺伝子含有ベクターへの導入による融合ベク

ターの構築, iii) 第三段階を発現ベクターへのサブクローニングの3工程からなる(J. Biol. Chem., 270(22), p12953-12956, 1995, Cell, 83, p803-812, 1995)。

i) ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体(mPPAR; mouse peroxisome proliferator-activated receptor; mPPAR α , mPPAR δ , mPPAR γ)のリガンド結合領域(PPAR-LBD)をPCR(polymerase chain reaction)により増幅させた。増幅に用いたテンプレートはマウス副睪丸周囲脂肪組織から、総RNA抽出試薬 Isogen (ニッポンジーン社製)を用い、添付マニュアルに従って総RNAを調製し用いた。各PPARサブタイプのリガンド結合領域をコードする遺伝子をクローニングする為に合成したプライマーの塩基配列は次の通り:mPPAR α (Gly¹⁶⁵~Tyr⁴⁶⁷); 5'-TTC CCG GGG ATG TCA CAC AAT GCA ATT CGC-3' (配列番号1)と5'-TTG GAT CCT CAG TAC AAA ATG TCT CTG TAG ATC TC-3' (配列番号2), mPPAR δ (Met¹³⁷~Tyr⁴³⁹); 5'-TTC CCG GGC ATG TCG CAC AAC GCT AT-3' (配列番号3)と5'-TTG GAT CCT TAG TAC ATG TCC TTG TAG ATT-3' (配列番号4), mPPAR γ (Gly¹⁷²~Tyr⁴⁷⁴); 5'-TTC CCG GGG ATG TCT CAC AAT GCC ATC-3' (配列番号5)と5'-TTG GAT CCC TAA TAC AAG TCC TTG TAG AT-3' (配列番号6)。GeneAmp PCR システム9600型を用いてPCR反応を行った。

ii) 予め、合成したプライマーの片側には、制限酵素 SmaI あるいは BamHI で切断可能なようにそれら認識配列を挿入しておいた。増幅後のPCR断片は、SmaI と BamHI で切断しておいた pGBT9 DNA-Binding Domain Vector(5.5kb, GAL4-DBD 領域とアンピシリン耐性遺伝子 Amp^R 配列を有する;加テック社製)にライゲーションすることによって導入し、これにより作成されたベクターを pGBT9-PPAR-LBD と命名した。

iii) pGBT9-PPAR-LBD の中に含まれる GAL4-DBD と PPAR-LBD を結合させた融合遺伝子領域(GAL4-DBD+PPAR-LBD)を HindIII/SalI を用いて切り出し、発現ベクター, pZeoSV(3.5kb, ゼオシン耐性遺伝子 Zeo^R 配列を有する;加テック社製)のマルチクローニングサイト(MCS)に HindIII/XhoI を用いて導入した。このようにして得られた GAL4-DBD と PPAR-LBD のキメラ蛋白質発現ベクターを、それぞれ GAL-PPAR α , GAL-PPAR δ , GAL-PPAR γ と命名した。

(2) レポーターベクターの構築

ルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標とするレポーターベクター (以下, RE-LUC と命

名する)の構築は、i)第一段階として GAL4 応答配列の作成、及び ii)第二段階として ルシフェラーゼ発現ベクターへのサブクローニングの2工程からなる(J. Biol.

Chem., 270(22), p12953-12956, 1995, Cell, 83, p803-812, 1995)。

i) GAL4-DBD の結合配列 [GAL4 応答配列; GAL4 responsive element, RE, 又は UAS_G] を1回 (RE×1) 及び3回繰り返したDNA配列 (RE×3) をDNA合成機(Beckman DNA 合成装置 Oligo1000M, ベックマン社製)を使用して合成した。適当な制限酵素サイトを両端に入れ、これらを結合させて4回繰り返し配列断片 (RE×4) を作成し、更にこれらを用いて8回繰り返し配列断片 (RE×8) を作成した。

ii) GAL4 応答配列 (RE×8) に TATA box 部分を連結させたDNA断片をPCRにより作成し、ルシフェラーゼアッセイシステム用ベクター [ピカジーンベクター2 (PGV-B2), 東洋インキ製造(株)] のルシフェラーゼ遺伝子配列上流5'-側にこれを挿入した (RE-LUC)。作成した RE-LUC に含まれる RE×8 及び TATA ボックスを含む挿入領域の塩基配列は、シーケンシングキット (PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit, アプライドバイオシステム社製) を用いて試料調製後、シーケンサー (ABI 373A DNA sequencer, アプライドバイオシステム社製) を使用してその塩基配列を確認した。RE×8 を含む RE-LUC は、GAL-PPAR γ と併せて細胞に導入し、PPAR γ のリガンドである CS-045 (トログリタゾン) を添加した際、得られるリガンド応答性 (ルシフェラーゼ活性) が、繰り返し回数の異なる他のもの (RE×2, ×3, ×4, ×5, ×6, ×10) と比較して最も強い活性を示すことから、本評価試験には RE×8 を使用した。

(3) PPAR α , PPAR δ 及び PPAR γ 活性化作用の測定

上記項目 (1) 及び (2) で作成したアクチベーションベクターとレポーターベクターを用いて、以下の3つの工程 [i) 構築物の宿主への共トランスフェクション, ii) 化合物添加による細胞処理, iii) レポーター遺伝子発現量の測定] により、化合物の PPAR 活性化作用を測定した。

1) (構築物の宿主への共トランスフェクション)

HepG2 細胞 (American Type Culture Collection, Maryland, USA) を1ウェル当たり 1×10^4 個の細胞濃度で、コラーゲンタイプ I V 処理 96 ウェルプレート (イワキ (株) 社製) にまき、2日間、10%の濃度で胎児ウシ血清 (FCS) を添加したダルベ

ツコ改変イーグル培地[200 μ l/well, FCS-DMEM (GIBCO BRL)]の存在下において培養した。その後、37℃に保温した100 μ l/wellの細胞培養用培地OPTI-MEM I Reduced Serum Medium(GIBCO-BRL製)で細胞を洗い、DNA含有溶液〔96ウェルプレートの1ウェル(50 μ l添加溶液)当たり、以下の成分を含有するもの；0.01 μ gのGAL-PPAR α あるいは-PPAR δ あるいは-PPAR γ , 0.1 μ gのRE-LUC ルシフェラーゼベクター, 0.02 μ gのpCH110 真核細胞発現ベクター[β -ガラクトシダーゼ発現用ベクター(遺伝子導入効率補正用), ファルマシア・イタリ(株)社製], 1 μ lのLipofectAMINE(GIBCO BRL), これらをOPTI-MEMに室温で15分間攪拌しながら溶解したもの〕を添加して、37℃で3時間培養した。

ii)(化合物添加による細胞処理)

細胞を10%FCS-DMEM 100 μ lで2回洗い、供試化合物(10^{-4} M, 5%ジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解したもの)を含む10% FCS-DMEM 200 μ lに新たに交換して更に48時間、37℃で培養を継続した。

iii)(レポーター遺伝子発現レベルの測定)

培地を除いた後、1ウェル当たり、ルシフェラーゼ活性測定用可溶化緩衝液(1倍希釈液, ピカジーン社製)100 μ lを添加して、室温で15~30分間放置した。そのうちの20 μ lを別な測定用プレートに分取して、ルシフェラーゼ基質溶液100 μ l(ピカジーン社製)を添加し、AB-2100型 化学発光測定装置(アトー社製)を用いて10秒間の発光量(ルシフェラーゼ活性)を求めた。ルシフェラーゼ遺伝子の添加と同時に、加えておいた β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子の細胞内導入による活性発現量を測定し、化合物添加によるルシフェラーゼ活性の変動を導入遺伝子のトランスフェクション効率で補正した。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定方法は、プロメガ(株)のマニュアルに準じて行った(Methods Enzymol., 152, p704-720, 1987, Biotechniques, 7, p576, 1989)。

20 μ lの可溶化試料を別な96ウェルプレートに分取し、ONPG溶液(o-nitrophenyl - β -D-galactopyranoside, プロメガ社製)100 μ lを添加して37℃で90分間インキュベートした。反応停止薬(1M炭酸ナトリウム溶液, プロメガ社製)50 μ lを加え、室温にて415nmの吸光度を測定した。溶媒として用いたジメチルスルフォニルオキシド(DMSO, 0.5%濃度)のみで処理した細胞のルシフェラーゼ

活性値（コントロール値）を 1.0 とし、相対的なリガンド活性を算出した（表 1）。

この結果、YM-16638 及び製造例 1 は、PPAR δ 及び γ の活性化作用を有することが確認された。

【表 1】

試験化合物		相対活性（コントロールを 1 とした場合の相対値）		
		PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
YM-16638		1.0	46.2***	2.5*
製造例 1		0.6	83.5***	10.3**
比較化合物	ピオグリタゾン ¹⁾	1.5	1.4	20.6***
	クロフィブレート ²⁾	2.2*	1.3	0.9
	Wy 14,643 ³⁾	25.0***	1.5	1.8
	cPGI ₂ ⁴⁾	15.2*	34.0**	1.6

統計的有意差検定 (Dunnett type t-test; two-way Dunnett-test):

*) $p < 0.05$, **) $p < 0.001$, ***) $p < 0.0001$

- 1) 前記文献 1 に記載の化合物
- 2) 前記文献 2 に記載の化合物
- 3) 前記文献 3 に記載の化合物
- 4) 前記文献 4 に記載の化合物

実施例 2（アカゲザルを用いた血清コレステロール低下作用評価試験）

Br. J. Pharmacol., 118, p174-178, 1996 に記載の方法に準じ、アカゲザルを用いた血清コレステロール低下作用評価試験を行った。

1) 体重約 4.5 ~ 5 kg の雄性アカゲザル（ハムリー社から購入）に対して、1 匹当たり、50 g のピュリナー粉末飼料（Code#5408, オリエンタル酵母社製）に 50 ml の水及びビタミン C (5 mg/kg/day, シグマ社製) を添加して固形状にしたものを 50 g、及びバナナ約 100 g を 1 日 2 回供与し飼育した。この条件下で飼育したアカゲザルに有意な体重の変動がないことを確認した。

11) コントロール食に適応させたサルを、対照群 4 匹、投与群 3 匹に分け、対照群には化合物非添加飼料を、投与群には YM-16638 が 30 mg/kg/day、製造例 1 が 30 mg/kg/day となるように添加調製した同飼料を 1 日 2 回投与した。バナナは飼料の食

べ残しを避けるため飼料50 gの摂食後に与えるようにした。

ii) 両群とも上記飼料で2週間飼育し、投与最終日の前日の約16時間前から絶食させた条件下で大腿部から採血した。採血は、被検薬剤の投与前及び投与後の2回、体重測定後に行った。採血したヘパリン処理血液から血清を分離し、日立736-10型自動分析装置を用いて、酵素法により総コレステロール(TC)及びLDL-Cを求めた(表2)。

なお、低下率は投与前値との比較により算出した。

【表2】

アカゲザル血清コレステロール低下作用

	TC 低下率	LDL-C 低下率
YM-16638 投与群(n=3)	33%*	14%*
製造例1 投与群 (n=4)	29%*	34%*

統計的有意差検定(Student's t-test): *) $p < 0.05$

この結果、YM-16638 及び製造例1は、優れた血清総コレステロール(TC)低下作用を示し、特にLDL-C低下作用を示すことが確認された。

製造例1

4-ヒドロキシフェニル酢酸メチル5.00 g, 1,3-ジブロモプロパン12.15 g, 及び炭酸カリウム8.32 gをN,N-ジメチルホルムアミド30ml中室温で3晩攪拌した。氷水200mlを加えて酢酸エチルで抽出し(200ml×1回), 有機層を水洗後(150ml×1回), 無水硫酸マグネシウム上で乾燥した。ろ過後, ろ液を濃縮して残さ8.12 gを得た。本残さ2.87 g, 2-プロピル-3-ヒドロキシ-4-アセチルフェノール1.94 g, 及び炭酸カリウム2.76 gをN,N-ジメチルホルムアミド30ml中室温で1晩攪拌した。氷水200mlを加えて酢酸エチルで抽出し(200ml×1回), 有機層を水洗後(200ml×1回), 無水硫酸マグネシウム上で乾燥した。ろ過後, ろ液を濃縮して得られた残さ4.30 gをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Merck, Kieselgel 60)に付し, クロロホルム溶出分から前駆体($R_f=0.75$, TLC板:Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254, 展開溶媒:クロロホルム)を

1. 63 g 得た。本前駆体 1. 63 g をメタノール 40 ml 及び 1 N 水酸化ナトリウム水溶液 20. 4 ml 中で 1 時間加熱還流した。放冷後、1 N 塩酸水 40 ml を加えた。析出した結晶をろ取、メタノール/水で洗った後、減圧下に乾燥することにより、p-[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸 1. 13 g を得た。

融点: 106-108°C

元素分析値 ($C_{22}H_{26}O_6$ として)

C(%) H(%)

理論値 68.38 6.78

実験値 68.35 6.84

赤外線吸収スペクトル $\nu_{\max}(\text{KBr}) \text{ cm}^{-1}$:

2968, 1700, 1638, 1586, 1520, 1504, 1472, 1420, 1378, 1274, 1250, 1126, 1066, 814, 790.

請求の範囲

1. ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用若しくは PPAR δ 及び γ 活性化作用を有する化合物, 又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下作用を有する医薬組成物。

2. コレステロール低下作用が LDL コレステロール低下作用である請求の範囲 1 記載の医薬組成物。

3. p-[3-(4-アセチル-3-ヒドロキシ-2-プロピルフェノキシ)プロポキシ]フェニル酢酸又はその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有するコレステロール低下作用を有する医薬組成物。

4. コレステロール低下作用を有する化合物を同定するための方法であって、ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 PPAR δ 活性化作用, 又は PPAR δ 及び γ 活性化作用を測定することを特徴とする方法。

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Pharmaceutical compositions for cholesterol lowering effect

<130> Y9811-PCT

<140>

<141>

<150> JP H09-198232

<151> 1997-07-24

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 5'-end

primer for cloning of ligand binding domain of
mouse peroxisome proliferator-activated receptor
alpha

<400> 1

ttcccgggga tgtcacacaa tgcaattcgc

30

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 3'-end

primer for cloning of ligand binding domain of

mouse peroxisome proliferator-activated receptor
alpha

<400> 2

ttggatcctc agtacaaaat gtctctgtag atctc

35

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 5'-end primer

for cloning of ligand binding domain of mouse

peroxisome proliferator-activated receptor delta

<400> 3

ttcccgggca tgtcgacaaa cgctat

26

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 3'-end
primer for cloning of ligand binding domain of
mouse peroxisome proliferator-activated receptor
delta

<400> 4

ttggatcctt agtacatgtc cttgtagatt

30

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 5'-end primer

for cloning of ligand binding domain of mouse

peroxisome proliferator-activated receptor gamma

<400> 5

ttcccgggga tgtctcacia tgccatc

27

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A 3'-end primer

for cloning of ligand binding domain of mouse

peroxisome proliferator-activated receptor gamma

<400> 6

ttggatccct aatacaagtc cttgtagat

29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03266

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ A61K45/00, 31/19, C12Q1/02 // C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ A61K45/00, 31/19, C12Q1/02 // C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FORMAN, Barry Mark et al., Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, April 1997, Vol. 94, pp.4312-4317	1-4
Y	JP, 2-215717, A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 28 August, 1990 (28. 08. 90) (Family: none)	1-4
Y	SHIMOKAWA, Teruhiko et al., Cholesterol-Lowering Effect of YM-16638 in Cynomolgus Monkeys. Drug Development Research, 1996, Vol. 38, pp86-92	2, 3
Y	JP, 62-174057, A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 July, 1987 (30. 07. 87) (Family: none)	3
Y	JP, 61-268657, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 November, 1986 (28. 11. 86) (Family: none)	3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 October, 1998 (20. 10. 98)Date of mailing of the international search report
27 October, 1998 (27. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A61K45/00, 31/19, C12Q1/02//C12N15/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A61K45/00, 31/19, C12Q1/02//C12N15/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	FORMAN, Barry Mark et al, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, April 1997, Vol. 94, pp. 4312-4317	1-4
Y	J P, 2-215717, A (山之内製薬株式会社) 28. 8月. 1990 (28. 08. 90) ファミリーなし	1-4
Y	SHIMOKAWA, Teruhiko et al, Cholesterol-Lowering Effect of YM-16638 in Cynomolgus Monkeys. Drug Development Research, 1996, Vol. 38, pp86-92	2, 3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
20. 10. 98	27.10.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 瀬下 浩 印	4 C 9284
	電話番号 03-3581-1101 内線 3453	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 62-174057, A (山之内製薬株式会社) 30. 7月 1987 (30. 07. 87) ファミリーなし	3
Y	JP, 61-268657, A (武田薬品工業株式会社) 28. 11月. 1986 (28. 11. 86) ファミリーなし	3